

Ассоциированные с полом и метаболическими нарушениями изменения в уровне матричных металлопротеиназ в экзосомах при колоректальном раке

Н.В. Юнусова, Е.А. Замбалова, М.Р. Патышева, А.А. Димча, О.В. Черемисина,
С.Г. Афанасьев, И.В. Кондакова

НИИ онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»;
Россия, 634009 Томск, Кооперативный переулок, 5

Контакты: Елена Анатольевна Замбалова etugutova@mail.ru

Цель исследования — оценить содержание матричных металлопротеиназ (ММП) MMP9 и MMP2, а также их индуктора EMMPRIN в циркулирующих экзосомах больных колоректальным раком (КРР) в связи с клиническо-морфологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями.

Материалы и методы. В исследование были включены 40 больных КРР (T2–4N0–2M0–1) и 10 пациентов контрольной группы. Экзосомы плазмы крови выделены методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием. Уровни MMP9, MMP2, а также их индуктора EMMPRIN оценивали с помощью проточной цитометрии.

Результаты и заключение. Экспрессия MMP9 в образцах экзосом была значимо выше у больных КРР по сравнению с больными с колоректальными полипами. Доля MMP9-отрицательных образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, и образцов с положительной экспрессией MMP9/MMP2/EMMPRIN, наоборот, была выше у пациентов с полипами по сравнению с больными КРР. Образцы латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие MMP9 и отрицательные по 2 другим маркерам, обладали как у больных КРР, так и у пациентов контрольной группы. Не выявлено значимых различий в экспрессии ММП и EMMPRIN в образцах экзосом плазмы крови больных КРР в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса. Выявлены гендерные различия в экспрессии ММП и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у больных КРР. Не обнаружено взаимосвязей экспрессии ММП и EMMPRIN в экзосомах и наличия метаболического синдрома, антропометрических параметров, уровней общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности и липопротеинов высокой плотности. Однако выявлены связи экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующих MMP9 и отрицательных по MMP2 и EMMPRIN ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$), а также экспрессирующих MMP9 и EMMPRIN и отрицательных по MMP2 ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$), с уровнями триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. Необходимы дальнейшие исследования по изучению характеристик экзосом, ассоциированных с метаболическими нарушениями, и возможности их использования в качестве диагностических, прогностических или предикторных маркеров.

Ключевые слова: экзосома, член семейства матричных металлопротеиназ, MMP2, MMP9, колоректальный рак, метаболический синдром

Для цитирования: Юнусова Н.В., Замбалова Е.А., Патышева М.Р. и др. Ассоциированные с полом и метаболическими нарушениями изменения в уровне матричных металлопротеиназ в экзосомах при колоректальном раке. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(3):28–36.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-3-28-36

Changes of exosomal matrix metalloproteinases level in colorectal cancer associated with sex and metabolic disturbance

N. V. Yunusova, E. A. Zambalova, M. R. Patysheva, A. A. Dimcha, O. V. Cheremisina, S. G. Afanas'ev, I. V. Kondakova

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativny Pereulok, Tomsk 634009, Russia

The objective is to evaluate the contents of matrix metalloproteinases (MMP) MMP9, MMP2, as well as their inducer EMMPRIN in circulating exosomes of patients with colorectal cancer in relation with clinical and morphological parameters, as well as with the presence of metabolic syndrome to search for promising exosomal markers associated with invasion, metastasis and metabolic disorders.

Materials and methods. The study included 40 patients with colorectal cancer (T2–4N0–2M0–1) and 10 control patients. Exosomes of blood plasma were isolated by ultrafiltration with ultracentrifugation. The level of MMP9, MMP2 and their inducer EMMPRIN in exosomes was evaluated by flow cytometry.

Results and conclusion. The level of MMP9-positive exosomes was significantly higher in patients with colorectal cancer compared with patients with colorectal polyps. The proportion of MMP9-negative and triple positive MMP9 +/MMP2+/EMMPRIN+ exosomes, on the contrary, was higher in patients with polyps compared with patients with colorectal cancer. Mixed subpopulation of MMP9+/MMP2–/EMMPRIN-exosomes

prevailed both in patients with colorectal cancer and in control patients. There were no significant differences in the subpopulations of MMP and EMMPRIN in the exosomes of colorectal cancer patients depending on the age, stage, grade and localization. Gender differences in the occurrence of a triple-positive exosome subpopulation in colorectal cancer patients have been revealed. No relationship was found between the expression of MMP and EMMPRIN in exosomes and the presence of the metabolic syndrome, anthropometric parameters, the level of total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, high density lipoprotein cholesterol. However, the relationships between MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-, MMP9+/MMP2-/EMMPRIN- and the level of triglycerides and glucose in blood serum were revealed. Further studies are needed to study the characteristics of exosomes associated with metabolic disorders and the possibility of their use as diagnostic, prognostic, or predictor biomarkers.

Key words: exosome, the member of matrix metalloproteinases family, MMP2, MMP9, colorectal cancer, metabolic syndrome

For citation: Yunusova N.V., Zambalova E.A., Patysheva M.R. et al. Changes of exosomal matrix metalloproteinases level in colorectal cancer associated with sex and metabolic disturbance. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(3):28–36.

Введение

Колоректальный рак (КРР) в настоящее время является одним из наиболее распространенных видов злокачественных новообразований и занимает 2–3-е место в структуре онкологической заболеваемости в России и большинстве развитых стран.

В настоящее время большое значение в процессах инвазии и метастазирования опухолей придают секретруемым внеклеточным везикулам, которые представлены экзосомами (30–100 нм) и микровезикулами (100–1000 нм). Они обнаружены во многих биологических жидкостях, таких как плазма, сыворотка крови, моча, слюна, грудное молоко, спинномозговая жидкость, асцит [1]. Тетраспанины CD9, CD63, CD81 являются экзосомальными биомаркерами и составляют около 12 % всех белков экзосом [2, 3]. Показано, что экзосомы несут различные протеазы, их активаторы и ингибиторы. В процессах опухолевой инвазии и метастазирования наибольшее значение отводят тетраспанинассоциированным протеазам, к которым относят, главным образом, ADAM10, ADAM17 и матриксные металлопротеиназы (MMP) [3]. Секретируемые (MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP13) и мембраносвязанные (MMP14, MMP24, MMP25) MMP выявлены в экзосомах, однако наиболее изучены MMP2 и MMP9. Также в экстраклеточных везикулах выявлен индуктор MMP EMMPRIN (CD147), а также ингибиторы MMP TIMP1, TIMP2 и TIMP3 [4]. Как незрелые, так и зрелые формы MMP2, MMP9, MMP 14, имеющие протеолитическую активность, выявлены в экстраклеточных везикулах, в том числе и в экзосомах, происходящих от опухолевых клеточных линий, включая клеточные линии КРР, а также нетрансформированных клеточных линий. Необходимо отметить, что зрелые формы ADAM-протеаз преимущественно находятся в экзосомах [5, 6]. Субстратами для MMP являются коллаген 4-го типа, эластин, фибронектин и ламинин, а также белки клеточной поверхности — Е-кадгерин, фибрин и интерлейкин 1. Таким образом, они модулируют взаимодействие клеток и внеклеточного матрикса [7]. Высокая внеклеточная активность MMP способствует росту опухоли, тканевой инвазии, ангиогенезу и метастазированию [8]. Перенос экзосомами MMP2, MMP3 и MMP9 увели-

чивает их содержание в отдаленных от первичной опухоли участках, в частности в лимфатических узлах и ткани легкого [9].

Примерно у 55–60 % больных КРР возникает на фоне метаболического синдрома. В соответствии с нашими ранее опубликованными данными метаболический синдром обнаружен примерно в 60 % случаев у больных КРР со стадиями II–III и менее распространен при метастатическом КРР [10, 11]. Показано, что экзосомы несут комплекс маркеров, связанных с ожирением и резистентностью к инсулину, а экзосомы, секретируемые адипоцитами, богаты MMP3 и способствуют метастазированию [12, 13]. В настоящее время свойства экзосом при КРР, связанные с ожирением или метаболическим синдромом, не описаны. Однако с учетом распространенности синдрома у больных с локализованными формами КРР представляется актуальным поиск таких экзосомальных маркеров, которые, возможно, будут полезны для диагностики КРР. У трети пациентов с локализованными формами КРР в течение 3 лет возникают рецидивы или развиваются гематогенные метастазы в печень [6]. Поэтому важен поиск молекулярных предикторов гематогенного метастазирования у пациентов с локализованным и местнораспространенным КРР в целях персонализации адъювантной терапии.

Цель исследования — оценка уровня содержания MMP9, MMP2, а также их индуктора EMMPRIN в циркулирующих экзосомах больных КРР и определение возможной ассоциации протеаз с клиническими и морфологическими параметрами, а также с наличием метаболического синдрома для поиска перспективных экзосомальных маркеров, связанных с инвазией, метастазированием и метаболическими нарушениями.

Материалы и методы

Образцы крови пациентов группы контроля ($n = 10$; возраст $45,3 \pm 4,1$ года) и больных КРР ($n = 40$; возраст $58,6 \pm 1,6$ года) с различными стадиями (T2–4N0–2M0–1) получены в НИИ онкологии ТНИМЦ (г. Томск). В контрольную группу были включены 10 пациентов, обследованных в условиях поликлинического отделения НИИ онкологии ТНИМЦ, у которых при обследовании, в том числе видеокколоноскопии, выявлены

колоректальные полипы, исключена злокачественная опухоль толстой и прямой кишки, а также другая онкологическая патология. Критериями исключения при формировании группы КРР явились первично-множественные формы КРР, стадия Ia (T1N0M0), а также рак прямой кишки с поражением средне- и нижеампулярного отдела.

Все пациенты с КРР были разделены на 2 подгруппы в зависимости от наличия метаболического синдрома: с метаболическим синдромом ($n = 24$) и без метаболического синдрома ($n = 16$). Критерием включения в группу с метаболическим синдромом с учетом рекомендаций Международной федерации диабета (2005) было наличие абдоминального типа ожирения (окружность талии >94 см для мужчин и >80 см для женщин) в сочетании, по крайней мере, с 2 из 4 дополнительных критериев: повышение уровня триглицеридов в сыворотке крови $>1,7$ ммоль/л или лечение дислипидемии; снижение уровня холестерина (ХС) липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) $<1,03$ ммоль/л для мужчин и $<1,29$ ммоль/л для женщин; высокое артериальное давление (систолическое >135 мм рт. ст. или диастолическое >85 мм рт. ст., или терапия артериальной гипертензии); повышение уровня глюкозы крови натощак $>5,6$ ммоль/л или выявленный сахарный диабет 2-го типа. Дополнительно у всех больных рассчитывали индекс массы тела по стандартной формуле, соотношение талии и бедер (waist-hip ratio), отражающее тип распределения жира. Уровень общего ХС определяли на биохимическом анализаторе. Клинические и гистологические параметры пациентов представлены в табл. 1. Исследование было одобрено локальным комитетом по медицинской этике НИИ онкологии ТНИМЦ.

Выделение экзосом. Экзосомы плазмы крови выделяли методом ультрафильтрации с ультрацентрифугированием [5]. Выделенные экзосомы ресуспендировали в 350 мкл PBS. Аликвоты экзосом замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C .

Электронная микроскопия экзосом и количественная оценка белка в экзосомах. Для негативного контрастирования образцы экзосом сорбировали на медные сетки с формваровой подложкой, стабилизированной углеродом, в течение 1 мин и 10 с и контрастировали 2 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Сетки были изучены с использованием просвечивающего электронного микроскопа Jem 1400 (Jeol, Япония), изображения получены с помощью цифровой камеры Veleta (Olympus Corporation, Япония).

Для оценки концентрации белка в экзосомах использовали набор количественного определения NanoOrange Protein (Molecular Probes, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Проточная цитометрия. Для выполнения проточной цитометрии 10 мкл (3×10^5 альдегид-сульфатных латексных частиц диаметром 4 мкм (4 %, A37304, Invitrogen)) отмывали дважды по 100 мкл 0,1 М MES-буфером

Таблица 1. Клинические и гистологические параметры больных КРР

Table 1. Clinical and histological parameters of patients with CRC

Параметр Parameter	n	%
Пол, n (%): Gender, n (%):		
мужской male	19	47,5
женский female	21	52,5
Возраст, лет: Age, years:		
≤ 59	12	30
> 59	28	70
Стадия: Stage:		
неметастатический КРР: non-metastatic CRC:	18	45,0
T2–4N0M0	17	42,5
T2–4N1–2M0	5	12,5
метастатический КРР metastatic CRC		
Степень дифференцировки: Differentiation grade:		
G ₁ –G ₂	35	87,5
G ₃	5	12,5
Метаболический синдром: Metabolic syndrome:		
есть present	22	55
нет absent	18	45

Примечание. КРР — колоректальный рак.

Note. CRC — colorectal cancer.

(pH 5,5; 3000g, 15 мин) и ресуспендировали в 25 мкл MES-буфера. Затем к 12,5 мкл частиц вносили по 3 мкг моноклональных антител против CD9 (ab134375, Abcam) при комнатной температуре в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Аликвоты экзосом (около 30 мкг белка) инкубировали с комплексами антитело — латексные частицы в 100 мкл PBS при температуре 4°C в течение 14 ч при осторожном перемешивании. Реакцию блокировали 0,2 М глицином в течение 30 мин при 4°C . Комплексы экзосомы — антитело — латексные частицы дважды отмывали промывочным буфером (PBS с добавлением 2 % бычьей сыворотки, деплетированной от экзосом), инкубировали с блокирующим иммуноглобулином G (BD Biosciences, США) при комнатной температуре в течение 10 мин, отмывали, затем проводили инкубацию с FITC-конъюгированными антителами против тетраспанинов (CD63, 557288, BD Biosciences, США; CD81, 551108, BD Biosciences, США, CD24, 555427, BD Biosciences, США) при температуре 4°C в течение 50 мин. Комплексы отмывали дважды промывочным буфером и исследовали образцы на цитометре Cytotflex (Beckman

Coulter, США), данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.0 Software. Медиана интенсивности флуоресценции (MFI) экзосом была проанализирована по сравнению с изотипическим контролем (BD Bioscience, США) и отрицательным контролем.

Анализ экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы. Аликвоты экзосом (около 30 мкг белка) инкубировали с 3×10^5 анти-CD9-латексными частицами в 150 мкл PBS при температуре 4 °C в течение ночи при осторожном перемешивании и блокировали в 0,2 М глицине в течение 30 мин, затем окрашивали anti-EMMPRIN (CD147) – APC (5 мл на тест, MAB5047, Abnova, США), anti-MMP2-PE (0,3–0,5 мг на тест, ABIN6170380, Antibodies-online, Германия) и anti-MMP9-FITC (1 мг на тест, ABIN2482809 Antibodies-online, Германия, США) в течение 20 мин при комнатной температуре. Проточная цитометрия выполнена на цитометре Cytotflex (Becton Coulter, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения CytExpert 2.0.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных проведена в программе Statistica 10.0. Данные проанализированы на соответствие выборки нормальному распределению с использованием критерия Шапиро–Уилка. Все данные выражены как средние со стандартными ошибками. Достоверность различий была оценена с помощью U-критерия Манна–Уитни и критерия Краскела–Уоллиса. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (r). При анализе учитывали только статистически значимые корреляционные связи ($p < 0,05$).

Результаты

Характеристика экзосом плазмы. Экзосомальная природа выделенных везикул была подтверждена при трансмиссионной электронной микроскопии. В препаратах, выделенных из плазмы крови контрольных пациентов и больных КРР, экзосомы визуализировались как четко структурированные частицы чашеобразной формы низкой электронной плотности с сохранной мембраной (рис. 1). В препаратах также присутствовали частицы, не соответствующие экзосомам по морфологии, их размер не превышал 100 нм. Выделенные экзосомы также охарактеризованы методом проточной цитометрии на наличие экзосомальных маркеров (CD24, CD9, CD81 и CD63). Сочетание конъюгированных и неконъюгированных антител позволяет идентифицировать различные субпопуляции экзосом (рис. 2). CD9/CD24-субпопуляция экзосом преобладала как у больных с колоректальными полипами, так и во всех подгруппах больных КРР. MFI CD9/CD24-популяции в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы больных КРР II стадии, составила 5500 ± 600 , больных КРР III стадии – 2400 ± 360 ($p < 0,05$) (рис. 3). Кроме этого, MFI CD9/CD24-популяции в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы больных КРР III

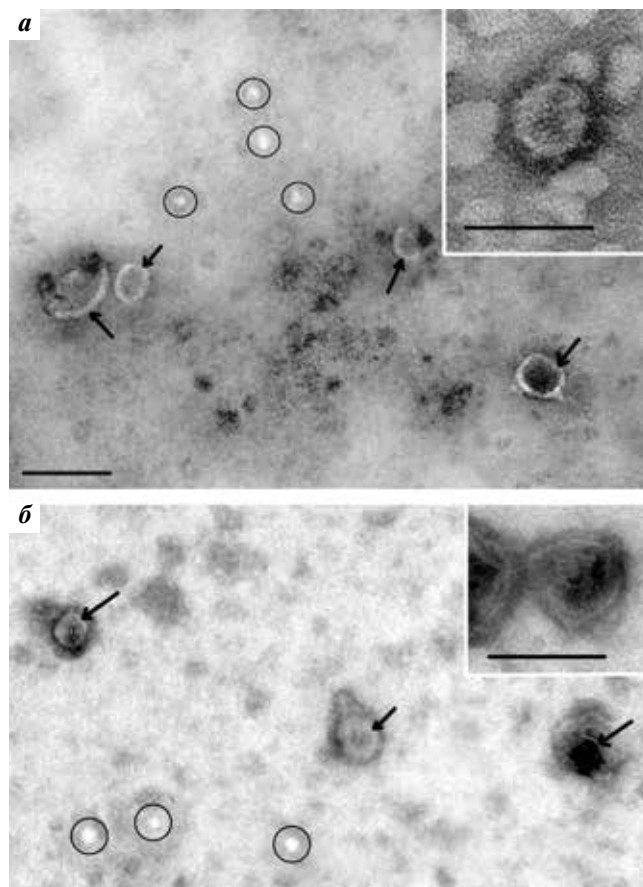


Рис. 1. Общий вид препаратов экзосом, полученных из плазмы крови: а – здорового пациента; б – больного колоректальным раком. На вставках изображены экзосомы. Стрелки указывают на экзосомы, эллипсы – «не-везикулы». Размер шкалы соответствует 100 нм. Электронная микроскопия, отрицательное контрастирование фосфорновольфрамовой кислотой

Fig. 1. General appearance of exosome samples retrieved from plasma: а – control patient; б – patient with colorectal cancer. Panels show exosomes. Arrows point at exosomes, ellipses at “non-vesicles”. Scale is 100 nm. Electron microscopy, negative contrast with phosphotungstic acid

стадии, была статистически значимо выше, чем у больных метастатическим КРР: 2400 ± 360 и 4000 ± 490 соответственно (см. рис. 3).

Анализ экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы крови. Для анализа экспрессии MMP и EMMPRIN выполняли проточную цитометрию с использованием латексных частиц, покрытых антителами к CD9. Стратегия гейтирования представлена на рис. 3. Поскольку наиболее часто в экзосомах больных КРР и контрольных пациентов экспрессировалась MMP9, акцент в работе сделан на изучение образцов латексных частиц, содержащих MMP9-положительные экзосомы (табл. 2). Выявлено, что MMP9-положительные экзосомы чаще встречались в плазме крови больных КРР, однако образцы частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие как MMP9, так и MMP2 и EMMPRIN, чаще встречались у пациентов контрольной группы. У пациентов как с колоректальными полипами, так и с КРР

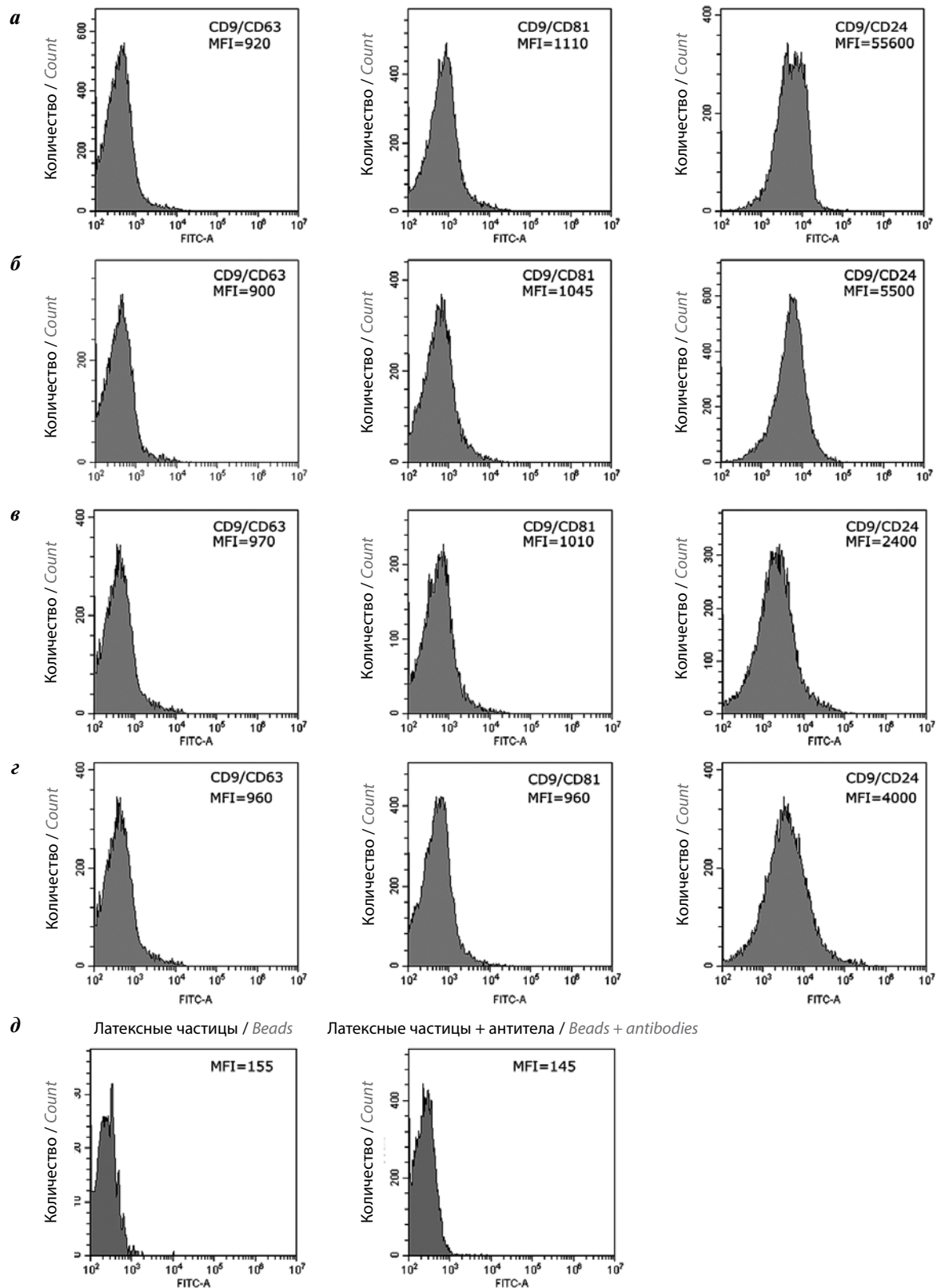


Рис. 2. Экспрессия CD63, CD81 и CD24 на CD9-положительных экзосомах плазмы крови здоровых лиц (а), больных колоректальным раком со II стадией (б), больных колоректальным раком с III стадией (в) и больных метастатическим КРР (г). Изотипический контроль и отрицательный контроль (латексные частицы, покрытые антителами к CD9 с CD81 FITC-антителами) (д). Представлены средние значения медианы интенсивности флуоресценции (MFI)

Fig. 2. Expression of CD63, CD81 and CD24 on CD9-positive exosomes from plasma of control patients (a), patients with stage II colorectal cancer (б), patients with stage III colorectal cancer (в) and patients with metastatic colorectal cancer (г). Isotypic control and negative control (latex particles covered in antibodies against CD9 with CD81 FITC-antibodies) (д). Mean values of median fluorescence intensity (MFI) are presented

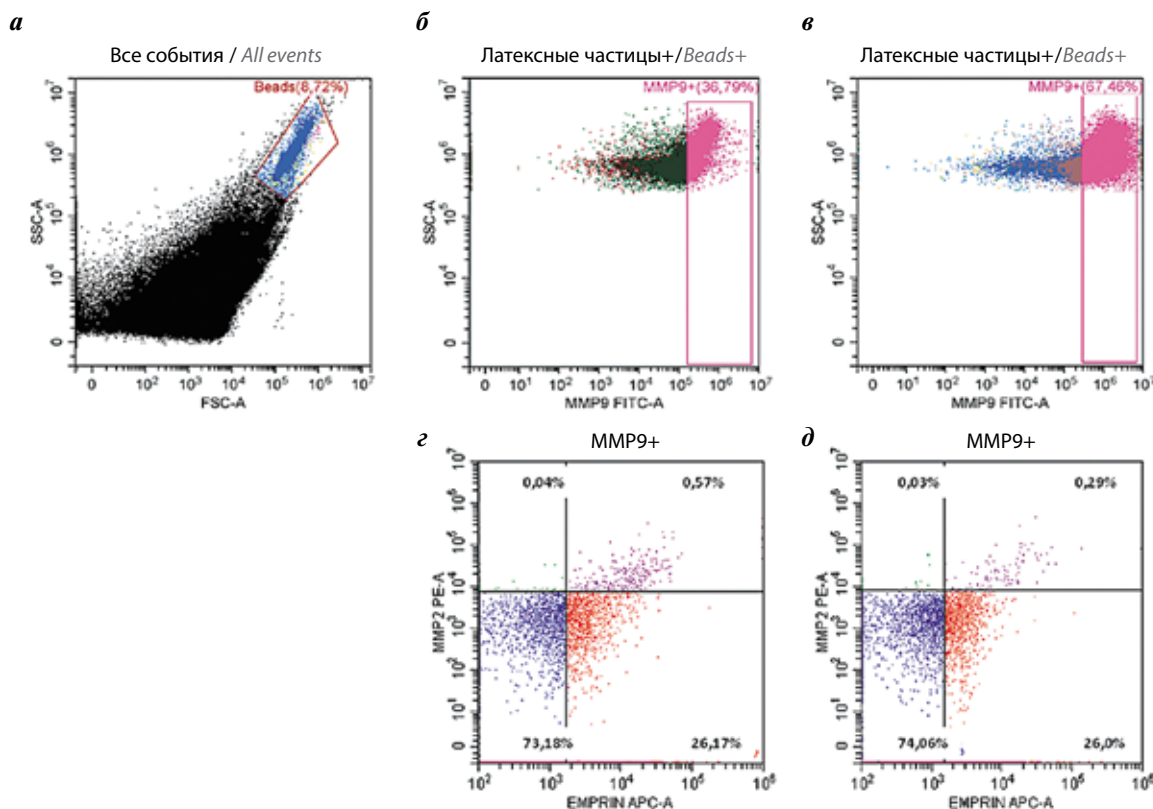


Рис. 3. Проточная цитометрия плазменных экзосом: а — прямое светорассеяние (FSC-A) и боковое светорассеяние (SSC-A) комплексов экзосом с альдегид-сульфатными латексными частицами; б — экспрессия матричной металлопротеиназы (ММР) MMP9 в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у контрольных пациентов; в — экспрессия MMP9 в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у больных колоректальным раком; г, д — тройное мечение антителами против MMP9, MMP2 и EMMPRIN образцов частиц, содержащих экзосомы контрольных пациентов (г) и больных колоректальным раком (д)

Fig. 3. Flow cytometry of plasma exosomes: а — forward scatter (FSC-A) and side scatter (SSC-A) of exosome complexes with aldehyde sulphate latex particles; б — expression of matrix metalloprotease (MMP) MMP9 in samples of latex particles containing exosomes in control patients; в — expression of MMP9 in samples of latex particles containing exosomes in patients with colorectal cancer; г, д — triple labeling with antibodies against MMP9, MMP2 and EMMPRIN of particles containing exosomes of control patients (г) and patients with colorectal cancer (д)

доминировали образцы латексных частиц, содержащих экзосомы, экспрессирующие MMP9, но отрицательные по MMP2 и EMMPRIN (до 73 %). Выявлены гендерные различия в экспрессии MMP9 и EMMPRIN у больных КРР. У женщин образцы латексных частиц, содержащих экзосомы с положительной экспрессией MMP и EMMPRIN, встречались чаще, чем у мужчин ($0,38 \pm 0,06$ и $0,20 \pm 0,05$ % соответственно; $p < 0,05$). Вообще, MMP9-положительные экзосомы у больных КРР также несколько чаще встречались у женщин, однако различия были недостоверными (табл. 3). Не выявлено значимых различий в экспрессии MMP и EMMPRIN в образцах экзосом плазмы крови больных КРР в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса.

Связь ММР экзосом с метаболическим синдромом и метаболическими нарушениями у больных КРР. В данном исследовании заболеваемость метаболическим синдромом у больных КРР составляла 60 %. Уровни MMP и EMMPRIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы, больных КРР был проанализирован не только с наличием метаболического синдрома,

но и с некоторыми антропометрическими параметрами, а также с уровнем глюкозы и липидным спектром сыворотки крови (триглицериды, общий ХС, ХС липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), ХС ЛПВП). Не выявлено связей экспрессии MMP и EMMPRIN в экзосомах с наличием метаболического синдрома, антропометрическими параметрами, уровнями общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП. Однако выявлены связи с уровнями триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. Графики рассеяния уровня экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы крови MMP9+/MMP2-/EMMPRIN- и MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+, от уровня триглицеридов ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$) и от уровня глюкозы плазмы крови ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$) представлены на рис. 4.

Обсуждение

Экспрессия MMP и EMMPRIN в экзосомах при КРР не зависела от стадии заболевания, поэтому маловероятно, что эти биомаркеры в экзосомах могут использоваться в качестве прогностических циркулирующих

Таблица 2. Экспрессия матричных металлопротеиназ (ММР) и их индуктора ЕММРIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы у здоровых лиц и больных колоректальным раком, % ($m \pm M$)

Table 2. Expression of matrix metalloproteases (MMP) and their inductor ЕММРIN in samples of latex particles containing exosomes in control patients and patients with colorectal cancer, % ($m \pm M$)

Показатель Characteristic	Контрольная группа Control patients	Больные колоректальным раком Patients with colorectal cancer	<i>p</i>
MMP9+	40,0 \pm 8,12	60,9 \pm 6,86	<0,05
MMP9 –	60,0 \pm 7,13	39,1 \pm 6,8	<0,05
MMP9+/MMP2+/ЕММРIN+	0,57 \pm 0,12	0,28 \pm 0,05	<0,05
MMP9+/MMP2–/ЕММРIN –	72,7 \pm 6,66	71,1 \pm 2,44	>0,05
MMP9+/MMP2–/ЕММРIN+	26,8 \pm 4,00	28,6 \pm 2,00	>0,05
MMP9+/MMP2+/ЕММРIN –	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	>0,05

Таблица 3. Гендерные различия в экспрессии матричных металлопротеиназ (ММР) и их индуктора ЕММРIN (%) в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы, у здоровых лиц и больных колоректальным раком, % ($m \pm M$)

Table 3. Gender differences in expression of matrix metalloproteases (MMP) and their inductor ЕММРIN (%) in samples of latex particles containing exosomes in control patients and patients with colorectal cancer, % ($m \pm M$)

Показатель Characteristic	Мужчины Males	Женщины Females	<i>p</i>
MMP9+	46,8 \pm 7,43	64,6 \pm 8,00	>0,05
MMP9–	53,2 \pm 7,15	34,4 \pm 7,12	>0,05
MMP9+/MMP2+/ЕММРIN+	0,20 \pm 0,05	0,38 \pm 0,06	<0,05
MMP9+/MMP2–/ЕММРIN–	72,7 \pm 3,17	70,4 \pm 3,90	>0,05
MMP9+/MMP2–/ЕММРIN+	27,1 \pm 2,18	29,2 \pm 2,00	>0,05
MMP9+/MMP2+/ЕММРIN–	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	>0,05

маркеров, полезных для оптимизации адъювантного лечения. Однако уровни ММР9-положительных, ММР9-отрицательных и ММР9+/ММР2+/ЕММРIN+ экзосом у пациентов с колоректальными полипами и КРР статистически значимо различались. Таким образом, актуальным является дальнейшее изучение экзосом, экспрессирующих ММР и ЕММРIN, для диагностики КРР.

В настоящее время КРР рассматривается как злокачественное новообразование, в значительной степени связанное с метаболическим синдромом [14]. В нашем исследовании не выявлено связей экспрессии ММР и ЕММРIN в экзосомах с наличием метаболического синдрома, антропометрическими параметрами, уровнями общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП, но обнаружены связи с уровнем триглицеридов и глюкозы в сыворотке крови. По-видимому, это связано с многокомпонентностью метаболического синдрома. В настоящее время выделяют 3-, 4- и 5-компонентный метаболический синдром. Обсуждается вопрос о существовании нескольких патогенетических вариантов метаболического синдрома [11]. По нашим дан-

ным, 15 % больных КРР не имеют метаболического синдрома, но страдают от избыточной массы тела или ожирения без каких-либо других метаболических нарушений или в сочетании только с одним измененным метаболическим параметром. Таким образом, около 75 % больных КРР имеют метаболические нарушения.

Заключение

Уровень ММР9-положительных образцов экзосом был значимо выше у больных КРР по сравнению с больными с колоректальными полипами. Доля ММР9-отрицательных образцов латексных частиц, содержащих экзосомы, и образцов с положительной экспрессией ММР9, ММР2 и ЕММРIN, наоборот, была выше у больных с полипами по сравнению с больными КРР. Образцы латексных частиц, содержащих ММР9-положительные экзосомы и отрицательные по ММР2 и ЕММРIN, преобладали как у больных КРР, так и в контрольной группе. Не выявлено значимых различий в экспрессии ММР и ЕММРIN в образцах латексных частиц, содержащих экзосомы плазмы

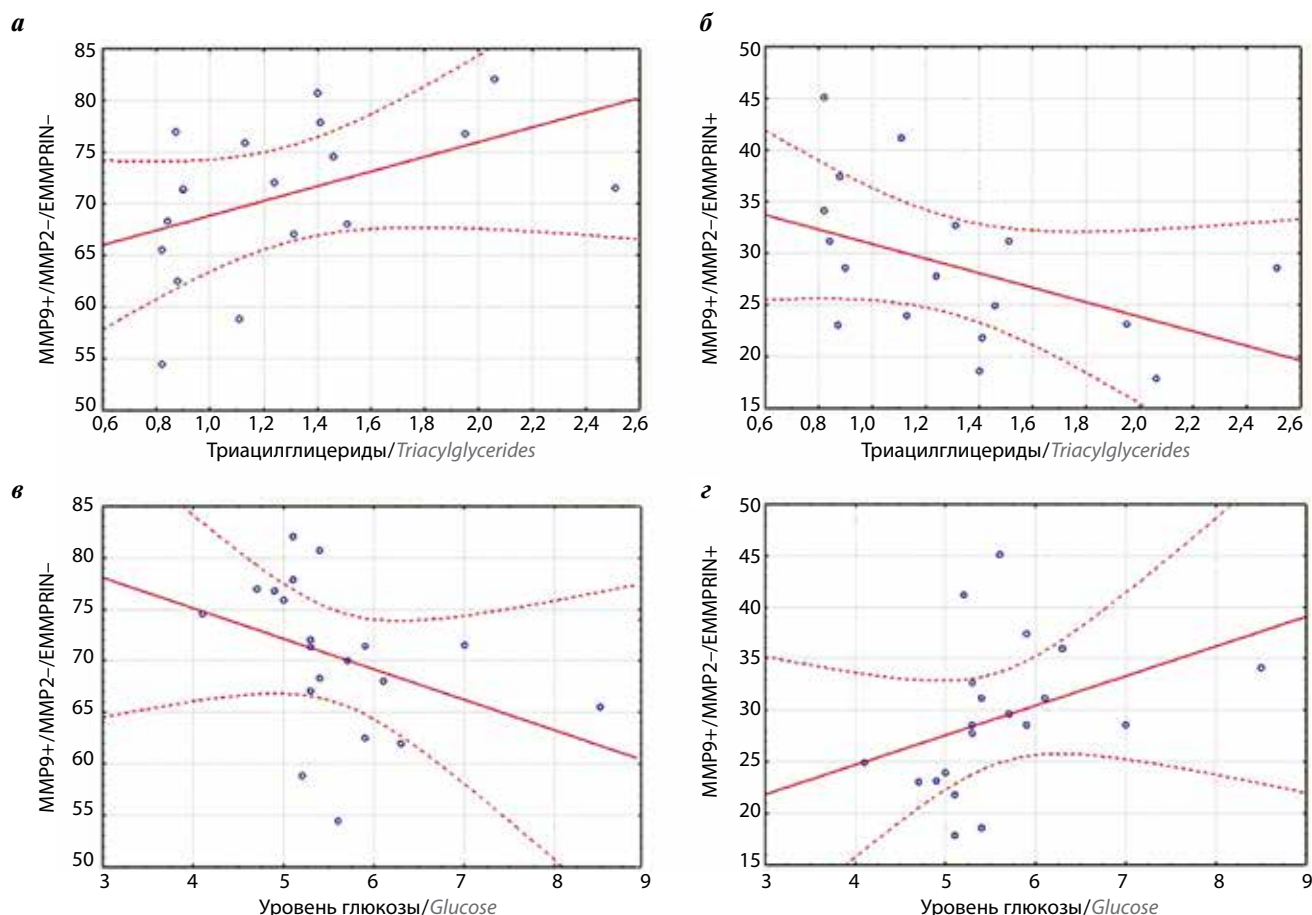


Рис. 4. Графики рассеяния. Зависимость экспрессии образцов латексных частиц, содержащих экзосомы $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ и $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$, от уровней триглицеридов (а, б) и глюкозы плазмы крови (в, г)

Fig. 4. Scatter plots. Dependence of expression of latex particle samples containing $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ and $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$ exosomes on plasma triglyceride (а, б) and glucose (в, г) levels

крови больных КРР, в зависимости от возраста, стадии, степени дифференцировки и локализации опухолевого процесса. Не обнаружено взаимосвязей экспрессии MMP, EMMPRIN в экзосомах и наличия метаболического синдрома, антропометрических параметров, уровней общего ХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП. Выявлены корреляционные связи экзосом плазмы крови $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN-$ и $MMP9+/MMP2-/EMMPRIN+$

с уровнями триглицеридов ($r = 0,51$ и $r = -0,56$ соответственно; $p < 0,05$) и глюкозы плазмы крови ($r = -0,60$ и $r = 0,57$ соответственно; $p < 0,05$). Необходимы дальнейшие исследования по изучению характеристик экзосом, ассоциированных с метаболическими нарушениями, и возможности их использования в качестве диагностических, прогностических или предикторных маркеров.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Li W., Li C., Zhou T. et al. Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer* 2017;16(1):145. DOI: 10.1186/s12943-017-0706-8.
- Yunusova N.V., Tamkovich S.N., Stakheeva M.N. et al. The characterization of exosome from blood plasma of patients with colorectal cancer. *AIP Conference Proceedings*; 2016;1760(1). DOI: 10.1063/1.4960289.
- Юнусова Н.В., Тугутова Е.А., Тамкович С.Н., Кондакова И.В. Роль тетраспанинов и протеаз экзосом в опухолевой прогрессии. *Биомедицинская химия* 2018;64(2):123–33. DOI: 10.18097/PBMC20186402123. [Yunusova N.V., Tugutova E.A., Tamkovich S.N., Kondakova I.V. The role of exosomal tetraspanins and proteases in tumor progression. *Biomeditsinskaya khimiya* =
- Biomedical Chemistry 2018;64(2):123–33. (In Russ.).]
- Shimoda M., Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017;1864(11PtA):1989–2000. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027.
- Tamkovich S.N., Yunusova N.V., Tugutova E.A. et al. Protease cargo in circulating exosomes of breast cancer and

- ovarian cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev* 2019;20(1):255–62. DOI: 10.31557/APJCP.2019.20.1.255.
6. Замбалова Е.А., Патышева М.Р., Димча А.А. и др. Экзосомальные протеазы при колоректальном раке. *Успехи молекулярной онкологии* 2018;5(4):117–26. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-117-126. [Zambalova E.A., Patysheva M.R., Dimcha A.A. et al. Exosomal proteases in colorectal cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):117–26. (In Russ.)].
 7. Friedl P., Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3(5):362–74. DOI: 10.1038/nrc1075.
 8. Huang K.J., Sui L.H. The relevance and role of vascular endothelial growth factor C, matrix metalloproteinase-2 and E-cadherin in epithelial ovarian cancer. *Med Oncol* 2011;29(1):318–23. DOI: 10.1007/s12032-010-9817-4.
 9. D'Souza-Schorey C., di Vizio D. Biology and proteomics of extracellular vesicles: harnessing their clinical potential. *Expert Rev Proteomics* 2014;11(3):251–3. DOI: 10.1586/14789450.2014.874290.
 10. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia-Pac J Clin Oncol* 2017;14(3):134–40. DOI: 10.1111/ajco.12780.
 11. Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A. et al. The role of metabolic syndrome variant in the malignant tumors progression. *Diabetes Metab Res Rev* 2018;12:807–12. DOI: 10.1016/j.dsx.2018.04.
 12. Eitan E., Tosti V., Suire C.N. et al. In a randomized trial in prostate cancer patients, dietary protein restriction modifies markers of leptin and insulin signaling in plasma extracellular vesicles. *Aging Cell* 2017;16(6):1430–3. DOI: 10.1111/ajco.12657.
 13. Wang J., Wu Y., Guo J. et al. Adipocyte-derived exosomes promote lung cancer metastasis by increasing MMP9 activity via transferring MMP3 to lung cancer cells. *Oncotarget* 2017;8(47):81880–91. DOI: 10.18632/oncotarget.18737.
 14. Esposito K., Chiodini P., Colao A. et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2012;35(11):2402–11. DOI: 10.2337/dc12-0336.

Вклад авторов

Н.В. Юнусова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Е.А. Замбалова: выделение экзосом, проточная цитометрия, статистический анализ, написание текста рукописи;
 М.Р. Патышева: проточная цитометрия, обзор публикаций по теме статьи;
 А.А. Димча: сбор клинических данных, анализ метаболических нарушений у больных;
 О.В. Черемисина: формирование клинической группы больных с колоректальными полипами;
 С.Г. Афанасьев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 И.В. Кондакова: анализ полученных данных.

Authors' contributions

N.V. Yunusova: reviewing of publications on the article's topic, analysis of obtained data, article writing;
 E.A. Zambalova: exosome isolation, flow cytometry, statistical analysis, reviewing of publications on the article's topic, article writing;
 M.R. Patysheva: flow cytometry, reviewing of publications on the article's topic;
 A.A. Dimcha: collecting of clinical data, analysis of metabolic disturbance
 O.V. Cheremisina: formation a group of patients with colorectal polyps;
 S.G. Afanas'ev: study design development, analysis of obtained data;
 I.V. Kondakova: analysis of obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.В. Юнусова/N.V. Yunusova: <https://orcid.org/0000-0003-4595-4177>
 Е.А. Замбалова/E.A. Zambalova: <https://orcid.org/0000-0003-3698-8455>
 М.Р. Патышева/M.R. Patysheva: <https://orcid.org/0000-0003-2865-7576>
 А.А. Димча/A.A. Dimcha: <https://orcid.org/0000-0002-9551-1908>
 О.В. Черемисина/O.V. Cheremisina: <https://orcid.org/0000-0000-7234-4708>
 С.Г. Афанасьев/S.G. Afanas'ev: <https://orcid.org/0000-0002-4701-0375>
 И.В. Кондакова/I.V. Kondakova: <https://orcid.org/0000-0003-0907-4615>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований и Администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703006.

Financing. The reported research was funded by Russian Foundation for Basic Research and the government of the Tomsk region of the Russian Federation, grant № 18-415-703006.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 02.07.2019. **Принята к публикации:** 17.09.2019.

Article received: 02.07.2019. **Accepted for publication:** 17.09.2019.